(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 2 月 9 日 (09.02.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/017700 A1

(51) 国際特許分類：
G01N 33/50 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 36/23 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2011/051807

(22) 国際出願日： 2011 年 1 月 28 日 (28.01.2011)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2010-174038 2010 年 8 月 2 日 (02.08.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1048010 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日比野 利彦 (HIBINO, Toshihiko) [JP/JP]; 〒2368643 神奈川県横浜市金沢区福浦 2－12－1 株式会社資生堂 リサーチセンター (金沢八景) 内 Kanagawa (JP). 江浜 律子 (EHAMA, Ritsuko) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2－2－1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 本山 晃 (MOTOYAMA, Akira) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2－2－1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 山田 章子 (YAMADA, Shoko) [JP/JP]; 〒2368643 神奈川県横浜市金沢区福浦 2－12－1 株式会社資生堂 リサーチセンター (金沢八景) 内 Kanagawa (JP). 山本 真実 (YAMAMOTO, Mami) [JP/JP]; 〒2368643 神奈川県横浜市金沢区福浦 2－12－1 株式会社資生堂 リサーチセンター (金沢八景) 内 Kanagawa (JP). 阪口 政清 (SAKAGUCHI, Masakiyo) [JP/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 許 南浩 (HUH Nam ho) [KR/JP]; 〒7008558 岡山県岡山市鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING CHRONIC INFLAMMATION SUPPRESSION AGENT OR CANCER METASTASIS SUPPRESSION AGENT HAVING INHIBITION OF BONDING OF EMMPRIN AND S100A9 AS INDICATOR

(54) 発明の名称 : エンプリンとＳ１００Ａ９の結合の阻害を指標とする慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for screening chronic inflammation suppression agents or cancer metastasis suppression agents that, when a candidate substance for being a chronic inflammation suppression agent or a cancer metastasis suppression agent significantly inhibits the bonding of EMMPRIN and S100A9 or S100A8/A9, evaluates the candidate substance as significantly suppressing chronic inflammation or cancer metastasis.

(57) 要約 : 本発明は、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補物質がエンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を有意に阻害する場合に、当該候補物質は慢性炎症又は癌転移を有意に抑制させると評価する、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法、を提供する。

WO 2012/017700 A1

明細書

発明の名称 :

エンプリンとＳ１００Ａ９の結合の阻害を指標とする慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、Ｓ１００Ａ９の新規受容体であるエンプリンを標的とする慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

背景技術

[0002] 過剰増殖や乾癬においてアップレギュレーションされるタンパク質としてＳ１００Ａ８およびＳ１００Ａ９が知られる。Ｓ１００Ａ８およびＳ１００Ａ９は、２０を超えるメンバーから構成されるＥＦ—ハンドカルシウム結合Ｓ１００タンパク質ファミリーに属する(非特許文献１ :Marenholz I et al., Biochem Biophys Res Commun (2004) 322:1111-1122)。どちらのタンパク質も好中球、活性化単球、およびマクロファージによって分泌され、それらの細胞の化学走性分子として機能し、炎症性細胞の漸増に関する正のフィ—ドバックループに関与する(非特許文献２ :Roth J et al., Trends Immunol (2003) 24:155-158)。Ｓ１００Ａ８およびＳ１００Ａ９陽性骨髄細胞は、炎症領域内に浸潤する最初の細胞である(非特許文献３ :Odink K et al., Nature (1987) 330:80-82)。慢性関節リウマチ(非特許文献４ :Liao H et al., Arthritis Rheum (2004) 50:3792-3803)、多発性硬化症(非特許文献５ :Bogumil T et al., Neurosci Lett (1998) 247:195-197)、クローン病(非特許文献６ :Lugering N, et al., Digestion (1995) 56:406-414)、および結合組織疾患(非特許文献７ :Kuruto R, et al., J Biochem (Tokyo) (1990) 108:650-653)を含む多数のヒト炎症性疾患で高いＳ１００Ａ８およびＳ１００Ａ９血清レベルが観察されている。従って、Ｓ１００Ａ８およびＳ１００Ａ９は、炎症の誘導および伝播に重要な役割を担うと考えられている。

[0003] 上皮細胞中でＳ１００八8と１００Ａ９が果たす生物学的機能について、本発明者は以前、外因性Ｓ１００Ａ８とＳ１００Ａ９が複合体（Ｓ１００Ａ８／Ａ９）（別名：カルプロテクチン）を形成することで正常表皮角化細胞（ＮＨＥＫ）を刺激して乾癬性病変などにおいて発現亢進される炎症性サイトカインを産生させ、さらにＳ１００Ａ８／Ａ９誘導性サイトカインがＮＨＥＫ中でのＳ１００八8および3１００Ａ９の産生および分泌を刺激することを明らかにした（非特許文献８：J Cell Biochem. 2007 Nov 28, Epub ahead of print）。さらに、Ｓ１００Ａ８／Ａ９自体がＮＨＥＫの増殖を増強することも見出した。これらの結果は、主要メデイエーターとしてＳ１０ＯＡ８／Ａ９が関与するＮＨＥＫの増殖と炎症の正のフィードバック機構の存在を明らかにした。即ち、Ｓ１００Ａ８／Ａ９が炎症性サイトカインの産生を誘導して炎症性疾患を惹起し、その炎症が細胞増殖を誘導し、さらには細胞増殖が炎症を誘導するといつたスパイラルを形成し、増殖・炎症が連鎖する持続性皮膚炎症性疾患、例えばアトピー性皮膚炎や乾癬などの原因となることが示唆された。

[0004] Ｓ１００Ａ８／Ａ９により引き起こされる慢性炎症の負のサイクル形成を阻止するためには、Ｓ１００Ａ８およびＡ９のレセプターの同定が必要と考えられる。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献１：Biochem Biophys Res Go國un (2004) 322:1111-1122

非特許文献２：Trends I國unol (2003) 24:155-158

非特許文献３：Nature (1987) 330:80-82

非特許文献４：Arthritis Rheum (2004) 50:3792-3803

非特許文献５：Neurosci Lett (1998) 247:195-197

非特許文献６：Digestion (1995) 56:406-414

非特許文献７：J Biochem (Tokyo) (1990) 108:650-653

非特許文献８：J Gell Biochem. (2008) 104:453-464

非特許文献9：Nature Gell Biol. (2006) 8(12) :1369-1375

非特許文献10 :Hum Genet (2002) 111:310-313

非特許文献11 :Morrison TB et aに, Biotechniques (1998) 24:954-958, 960, 962

発明の概要

発明が解決しょうとする課題

[0006] 本発明は、Ｓ１００Ａ９の新規受容体を標的とする慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] Ｓ１００タンパク質ファミリーの受容体として知られているＲＡＧＥ (Receptor for advanced glycation endoproducts) は、Ｓ１００Ａ９とも結合することが本発明者らにより確認された。しかしながら、両者の結合による信号系の存在は、中和抗体、ｓｉＲＮＡ試験のいずれによっても確認できなかった。

[0008] そこで、本発明者らが、培養ケラチノサイトからＳ１００Ａ８及び／又はＡ９と結合するタンパク質を単離してＬＣ／ＭＳ／ＭＳ解析にかけ、Ｓ１００Ａ８／Ａ９結合タンパク質の同定を試みた結果、Ｓ１００Ａ９のレセプター候補が多数発見された。その中から、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、且つ膜貫通型の糖タンパク質であるエンプリン (E國prin) (The extracellular matrix metalloproteinase inducer) (別名/ベシシン又はＣＤ１４７) に着目したところ、エンプリンの発現の抑制によりＳ１００Ａ９によるサイトカイン誘導やマトリックスメタロプロテアーゼ誘導が顕著に低下することが分かった。また、免疫染色の結果は、Ｓ１００Ａ９及びエンプリンがアトピー性皮膚炎や乾癬に罹患している患者の表皮、そして、浸潤するメラノーマ細胞において強発現していることを示した。

[0009] 従って、エンプリンがＳ１００Ａ９のレセプターであること、そして、これらの間の結合を阻害することで、慢性炎症の抑制、更には癌の転移を抑制することが見出され、本発明が完成するに至った。

[0010] 従って、本願は以下の発明を包含する：

（1）慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補物質がエンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を有意に阻害する場合に、当該候補物質は慢性炎症又は癌転移を有意に抑制させると評価する、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法。

（2）慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補物質の存在下、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９とをインキュベートし、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する物質を慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤として選定することを含んで成る、（1）に記載の方法。

（3）エンプリンが固体支持体に固相化されている、（1）又は（2）に記載の方法。

（4）前記結合の阻害がＥＬＩＳＡ法により決定される、（1）～（3）のいずれかに記載の方法。

（5）エンプリンとＳ１００Ａ９との結合を阻害する薬剤を含んで成る、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤。

（6）前記薬剤が、ヨモギ、トウキ及びオドリコソウから成る群から選択される植物体又はその抽出物を一種又は二種以上含む、（6）に記載の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤。

（7）エンプリンとＳ１００Ａ９との結合を阻害する薬剤を被験者に投与することを含んで成る、慢性炎症又は癌転移の抑制方法。

（8）前記薬剤が、ヨモギ、トウキ及びオドリコソウから成る群から選択される植物体又はその抽出物を一種又は二種以上含む、（9）に記載の方法。

発明の効果

[0011] エンプリンは、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）を誘導して癌の転移を誘導する。このように、エンプリンと悪性腫瘍との関係はよく知られている。また、Ｓ１００Ａ８／Ａ９についても、転移の好発部位は、癌細胞が出すＶＥＧＦ、ＴＮＦ等の因子などと反応して、Ｓ１００Ａ８／Ａ９を

分泌し、これが癌細胞の転移を誘導することが知られている(非特許文献9:Nature Cell Biol. (2006) 8(12):1369-1375)。本発明者らが培養ケラチノサイトをＳ１００Ａ８／Ａ９で刺激したところ、癌の浸潤に関与するＭＭＰは、当該刺激により発現が亢進されたものの、エンプリンをノックダウンした場合にはその発現が有意に抑制されることが確認された(結果は示さず)。従来、ＭＭＰの発現亢進はエンプリンの自己分泌ループによると考えられていたが、上記の結果は、ＭＭＰの発現はエンプリンのみでは亢進されず、Ｓ１００Ａ９刺激を経由することが必要であることを示している。

[0012] 癌細胞の転移に関与しているエンプリンがＳ１００Ａ９のレセプターとして機能していることは、本発明者らによって初めて見出された。実際、エンプリンの発現を抑制することでＳ１００Ａ９によるサイトカインやＭＭＰの発現亢進は低下する(実施例)。そのため、エンプリンとＳ１００Ａ９の関係を考慮すれば、癌の転移とその悪性度について新たな解釈が可能になると考えられる。更に、エンプリンは、Ｓ１００Ａ９と同様にアトピー性皮膚炎や乾癬の患者の表皮上層やメラノーマ細胞の表皮において発現していたため、両者はアトピー性皮膚炎、乾癬、癌等の慢性炎症にも関与していることが予想される。従って、本発明によれば、エンプリンとＳ１００Ａ９との結合の阻害を指標とすることで、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の探索が可能になる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] エンプリンの一次構造。

[図2] 多次元キャピラリーＬＣ／ＭＳ／ＭＳを用いたタンパク質の網羅的解析法により同定されたＳ１００Ａ９の受容体候補タンパク質。

[図3] エンプリンｓｉＲＮＡによるエンプリンの発現抑制効果。

[図4] エンプリンの発現抑制に伴うサイトカインの発現変化。

[図5] エンプリンの発現抑制に伴うＭＭＰの発現変化。

[図6] ウエスタンブロットによるエンプリン結合タンパク質の同定。矢印はＳ１００Ａ９のバンドを示す。

[図7] 可溶性エンプリンによるＭＭＰ１の誘導効果。

[図8A] ヒト正常皮膚におけるエンプリン及びＳ１００タンパク質の局在を示す免疫染色図。

[図8B] 皮膚モデルにおけるエンプリン及びＳ１００タンパク質の局在を示す免疫染色図。

[図8G] アトピー性皮膚疾患皮膚におけるエンプリン及びＳ１００タンパク質の局在を示す免疫染色図。

[図8D] Ｓ１００Ａ８抗体、２７Ｅ１０、Ｄａｐｉを用いて免疫染色したアトピー性皮膚炎及び乾癬の皮膚の比較。

[図8E] Ｓ１００Ａ９抗体、２７Ｅ１０、Ｄａｐｉを用いて免疫染色したアトピー性皮膚炎及び乾癬の皮膚の比較。

[図8F] メラノーマ組織におけるＳ１００Ａ９の局在を示す免疫染色図 (上段はＨＥ染色、中段はＳ１００Ａ９抗体による染色、下段はＤＡＰＩ染色。左側、中央、右側の写真はそれぞれ異なるサンプルに由来する）。

[図8G] 悪性メラノーマにおけるＳ１００Ａ９の局在を示す免疫染色図。

[図8H] メラノーマ組織におけるエンプリンの局在を示す免疫染色図。

[図9] ＰＬＡ (Proximity Ligation Assay) 法によるアトピー性皮膚におけるエンプリンとＳ１００Ａ９の相互作用の証明 (２００倍）。

[図10] ＰＬＡ法によるァトビー性皮膚におけるエンプリンとＳ１００Ａ９の相互作用の証明 (４００倍）。

[図11] Ｓ１００Ａ９とエンプリンとの結合を阻害する植物抽出物のスクリーニング結果。

[図12] ョモギエキス、ォドリコソゥエキス、トウキエキスのＳ１００Ａ９-エンプリン結合阻害効果の比較。

発明を実施するための形態

[0014] エンプリンは、２個のＩｇドメインを有する、１回膜貫通型の糖タンパク質であり、コラゲナーゼ (ＭＭＰ—１) の発現亢進作用を有している。エンプリンヌルマウスには、精子形成、受精、感覚機能及び記憶機能、並びに混

合リンパ球反応の欠損が見られる。エンプリンの一次構造を図１に、そしてエンプリンの全長配列を配列番号１に示す。ＭＭＰ—１で切断されたＩｇドメイン１は、コラーゲンの発現を誘導する。

[0015] 本発明のスクリーニング方法は、特に限定されるものではないが、候補物質の存在下エンプリンとＳ１００Ａ９とをインキュベーションし、エンプリンとＳ１００Ａ９との結合を有意に阻害する候補薬剤をＳ１００Ａ９に起因する慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤として選択することからなる。その評価基準として、例えばエンプリンとＳ１００Ａ９タンパク質との結合がコントロールを作用させた場合と比べ10% 以上、又は20% 以上、又は30% 以上、又は50% 以上、又は70% 以上、又は100% 阻害されていたなら慢性炎症又は癌転移を「有意に抑制する」、と判断してよい。

[0016] Ｓ１００Ａ９は、上述のとおりＳ１００Ａ８と複合体を形成していることがあり、この複合体がエンプリンと結合することもある。従って、Ｓ１００Ａ８／Ａ９とエンプリンとの結合を阻害する物質を慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤としてスクリーニングしてもよい。

[0017] エンプリンとＳ１００Ａ９との結合の阻害を検出する手段は特に限定されるわけではないが、ＥＬＩＳＡ法に基づきエンプリンとＳ１００Ａ９（又はＳ１００Ａ８／Ａ９）との結合における検量線を作製し、この結合を阻害する分子、すなわち吸光度の低下する分子を慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補薬剤として検出することができる。良好な検出感度を確保する観点から、固体支持体に吸着される分子は、分子量が大きいエンプリンが好ましい。

[0018] 本明細書で使用する「慢性炎症」は、アトピー性皮膚炎、乾癬の他、癌なども包含する。また、本明細書で使用する「癌転移抑制」とは、癌細胞が原発巣である組織から、浸潤、血中およびリンパ管を通しての遊走、新たな組織への定着を経て、増殖を開始する過程のいずれかもしくは全てを抑制することを意味し、癌細胞の増殖抑制とは異なる。

[0019] Ｓ１００Ａ８およびＡ９

Ｓ１００Ａ８およびＡ９のアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列は、例えばHum Genet (2002) 111:310-313（非特許文献１０）に公開されている。本発明において使用できるＳ１００Ａ８およびＡ９は、通常ヒト由来の天然型、あるいは組み換えタンパク質であるが、活性を有すれば改変型、異種由来、もしくは非精製品を用いることができる。Ｓ１００Ａ８およびＡ９の組換タンパク質は、当業界で周知の方法に従い、例えば単離したまたはＰＣＲにより合成したＳ１００Ａ８又はＡ９遺伝子（cDNA）を例えばプラスミド、ウィルス等に挿入して発現ベクターを調製し、これを宿主細胞、例えば微生物、動物細胞又は植物細胞等の培養細胞に導入し、発現させることにより、大量調製することが可能である。

[0020] Ｓ１００Ａ９は、水や培地、例えば表皮角化細胞の培養に適当な培地、例えば上記EpiLife（登録商標）培地に溶解し、本発明のスクリーニング系に添加する。添加量は、一概には規定できないが１ｎｇ／ｍｌから１ｍｇ／ｍｌ程度、好ましくは１０ｎｇ／ｍｌから１００μｇ／ｍｌ程度、より好ましくは１００ｎｇ／ｍｌから１０μｇ／ｍｌ程度の濃度とする。Ｓ１００Ａ９またはＳ１００Ａ８／Ａ９の添加は、好ましくは塩化カルシウムの存在下で行う。Ｓ１００Ａ９またはＳ１００Ａ８／Ａ９の存在下でのインキュベーション時間、インキュベーション温度といった培養条件は特に制限されることはなく、好ましくは３０～３７℃で１～１４時間、より好ましくは３４～３７℃で２～７時間、好ましくは$CO_2$５％の下でインキュベーションを行う。

[0021] 本発明の慢性炎症抑制剤は、Ｓ１００Ａ８／Ａ９に起因する持続性皮膚炎症性疾患、例えばアトピー性皮膚炎、乾癬などの予防、治療といった改善等に有効な医薬品又は化粧品として利用できる。

[0022] 本発明のスクリーニング方法により得られた慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤として、ヨモギ、トウキ及びォドリコソゥから成る群から選択される植物体又はその抽出物が挙げられる。特に、ヨモギエキスはＳ１００Ａ９とエンプリンとの結合を有意に阻害することが確認されているため（図１２）、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の好ましい活性成分であることが予想され

る。ここで、本発明で使用する各植物の植物体又はその抽出物は、各々の植物体の各種部位（花、花穂、果皮、果実、茎、葉、枝、枝葉、幹、樹皮、根茎、根皮、根、種子又は全草など）をそのまま又は乾燥したものを粉砕して乾燥粉末としたもの、あるいはそのまま又は乾燥・粉砕後、溶媒で抽出したものである。

[0023] 抽出物の場合、抽出に用いられる抽出溶媒は通常抽出に用いられる溶媒であれば何でもよく、特にメタノール、エタノールあるいは１，３—ブチレングリコール等のアルコール類、含水アルコール類、アセトン、酢酸ェチルェステル等の有機溶媒を単独あるいは組み合わせて用いることができ、このうち特に、アルコール類、含水アルコール類が好ましく、特にメタノール、ェタノール、１，３—ブチレングリコール、含水エタノールまたは含水１，３-プチレングリコールが好ましい。また前記溶媒は、室温乃至溶媒の沸点以下の温度で用いることが好ましい。

[0024] 抽出方法は特に制限されるものはないが、通常、常温から、常圧下での溶媒の沸点の範囲であれば良く、抽出後は濾過又はイオン交換樹脂を用い、吸着・脱色・精製して溶液状、ペースト状、ゲル状、粉末状とすれば良い。更に多くの場合は、そのままの状態で利用できるが、必要ならば、その効果に影響のない範囲で更に脱臭、脱色等の精製処理を加えても良く、脱臭・脱色等の精製処理手段としては、活性炭カラム等を用いれば良く、抽出物質により一般的に適用される通常の手段を任意に選択して行えば良い。

[0025] 植物体の抽出部位として、ヨモギの場合、葉が、トウキの場合、根が、ォドリコソゥの場合、茎、葉、花が考えられるが、抽出部位はこれらに限定されない。

[0026] 上記溶媒で抽出して得られた抽出物をそのまま、あるいは例えば凍結乾燥などにより濃縮したエキスを使用でき、また必要であれば吸着法、例えばィオン交換樹脂を用いて不純物を除去したものや、ポーラスポリマー（例えばアンバーライトＸＡＤ—２）のカラムにて吸着させた後、所望の溶媒で溶出し、さらに濃縮したものも使用することができる。

[0027] 本発明の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤は、前記植物体又はその抽出物の一種または二種以上からなるものであることが好ましいが、本発明の効果を損なわない範囲において、他の種々の成分を含有することができる。また、本発明の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤は、その使用目的に合わせて用量、用法、剤型を適宜決定することが可能である。例えば、本発明の慢性炎症抑制剤の投与形態は、経口、非経口、外用等であってよい。剤型としては、例えば錠剤、粉剤、カプセル剤、顆粒剤、エキス剤、シロップ剤等の経口投与剤、又は注射剤、点滴剤、若しくは坐剤等の非経口投与剤軟膏、クリーム、乳液、ローション、パック、浴用剤等の外用剤を挙げることができる。

[0028] 本発明の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の上記エキス成分の配合量は、用途に応じて適宜決定できるが、一般には阻害剤全量中、乾燥物として0.0001〜20.0質量%、好ましくは0.0001〜10.0質量%である。ヨモギエキス、ォドリコソゥエキス、トウキエキスは濃度依存的に慢性炎症又は癌転移を抑制することが考えられる。

[0029] また、慢性炎症抑制剤中又は癌転移抑制剤中には、上記薬剤以外に、例えば、通常の食品や医薬品に使用される賦形剤、防湿剤、防腐剤、強化剤、増粘剤、乳化剤、酸化防止剤、甘味料、酸味料、調味料、着色料、香料等、化粧品等に通常用いられる美白剤、保湿剤、油性成分、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色剤、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を必要に応じて適宜配合することができる。

[0030] さらに、本発明の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤を皮膚外用剤として使用する場合、皮膚外用剤に慣用の助剤、例えばェデト酸二ナトリウム、ェデト酸三ナトリゥム、クエン酸ナトリゥム、ポリリン酸ナトリゥム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属封鎖剤、カフェイン、タンニン、ベラパミル、トラネキサム酸およびその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフヱロール、グリチルリチン酸およびその誘導体またはその塩等の薬剤、ビタミンC、ァスコルビン酸リン酸マグネシウム、ァスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美

白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類、レチノイン酸、レチノール、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA類なども適宜配合することができる。

[0031] 以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

実施例

[0032] １．新規Ｓ１００Ａ９受容体候補のスクリーニング

培養ケラチノサイトから回収したタンパク質混合物とＧＳＴ融合Ｓ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９タンパク質とを混合した後、このサンプルについてキャピラリーＬＣ／ＭＳ／ＭＳによるタンパク質の網羅的解析法を行った。

[0033] ＬＣ／ＭＳ／ＭＳ解析

内径１００〃ｍ、長さ１２Ｏｍｍの未充填のキャピラリーカラム（Ｎｅｗ Ｏｂｊｅｔｉｖｅ社製）のテーパー状の出口側の端部に、充填剤を保持するために、シリカ製のフリットを作製した。得られたキャピラリーカラムに、平均粒径が５μｍのォクタデシル化シリカ型充填剤Ａｑｕａ Ｃ１８（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社製）を、高さが１００ｍｍとなるように充填し、分析用逆相キャピラリーカラムを得た。

[0034] 内径２５０パｍ、長さ１５Ｏｍｍの未充填のキャピラリーカラム（Ａｇｉｌｅｎｔ社製）の出口側の端部に、充填剤を保持するために、シリカ製のフリットを作製した。得られたキャピラリーカラムの出口側に、平均粒径が５μｍのカチオン交換樹脂型充填剤Ｐａｒｔｉｓｐｈｅｒｅ ＳＣＸ ｒｅｓｉｎｓ（Ｗｈａｔｍａｎ社製）と、平均粒径が５〃ｍのァニオン交換樹脂型充填剤ＰｏｌｙＷＡＸ ＬＰ（ＰｏｌｙＬＣ社製）を質量比２：１で混合したもの、入口側に、平均粒径が５μｍのォクタデシル化シリカ型充填剤Ａｑｕａ Ｃ１８（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社製）を、それぞれ高さが２５ｍｍとなるように充填し、トラップ用逆相キャピラリーカラム及びＳＣＸ—ＷＡＸ混合キャピラリーカラムからなる二相型キャピラリーカラムを得た。

[0035] なお、分析用逆相キャピラリーカラム及び二相型キャピラリーカラムを作製する際には、高圧窒素ガス及び加圧型充填容器を用いて、スラリー充填法により充填剤を充填した。

[0036] 続いて、６ステップのＭｕｄＰＩＴ型分析（二次元ＨＰＬＣ／ＥＳＩ ＭＳ／ＭＳ）により、上記タンパク質混合物を分析した。

[0037] まず、ペプチドを約４リｇ含む上清を、加圧法により、二相型キャピラリーカラムにロードした後、試料溶液の１０倍以上の体積の移動相Ａ（水、アセトニトリル及びギ酸の体積比９５：５：０．１の混合液；ｐＨ〜２．６）を用いて、洗浄、脱塩した。この二相型キャピラリーカラム１０を、貫通孔型ユニオン（Ｕｐｃｈｕｒｃｈ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）（不図示）を介して、分析用逆相キャピラリーカラム２０と接続した。次に、内径が１００μｍのキャピラリーを配管として用いたＮａｎｏｓｐａｃｅ ＳＩ—２型ＨＰＬＣ装置（資生堂社製）に接続した。このとき、トラップ用逆相キャピラリーカラム１１は、ＳＣＸ—WAＸ混合キャピラリーカラム１２及び分析用逆相キャピラリーカラム２０の上流側に配置した。

[0038] 移動相としては、移動相Ａ、移動相Ｂ（水、アセトニトリル及びギ酸の体積比２０：８０：０．１の混合液）、移動相Ｃ（５０ＯｍＭの酢酸アンモニウムを含む移動相Ａ；ｐＨ〜６．８）を用い、ペプチドの溶出法は、矩形状に加える移動相Ｃの体積％をステツプ毎に漸増させた、計６ステツプのグラジエント溶出法とした。

[0039] ステップ１のグラジエントプロファイルは、５分間移動相Ａを流し、次の５分間で移動相Ｂの比率を０体積％から１５体積％まで増加させ、次の６０分間で移動相Ｂの比率を４５体積％まで増加させ、次の１０分間で移動相Ｂの比率を７５体積％まで増加させた後、この比率で５分間流すものである。

[0040] ステップ２〜６のグラジエントプロファイルは、１分間移動相Ａを流し、次の４分間移動相Ｃの比率をＸ［体積％］として流し、次の５分間で移動相Ｃの比率を０体積％から１５体積％まで増加させ、次の６０分間で移動相Ｃの比率を４５体積％まで増加させ、次の１０分間で移動相Ｃの比率を７５体

積％まで増加させた後、この比率で5分間流すものである。このとき、ポンプの送液の流速を250μL／分とし、抵抗型キャピラリーによるスプリットにより、カラムの流速を300～400nL／分に調整した。

[0041] また、ESI MS／MSを測定する際には、イオントラップ型質量分析計LCQ－Deca（Thermo Fisher Scientific社製）を用いた。このとき、分析用逆相キャピラリーカラムから溶出されたペプチドは、スプリットすることなく、質量分析計に直接導入した。

[0042] なお、質量電荷比（m／z）が400～1400のフルスキャンMSスペクトル測定1回及びデータ依存型MS／MSスペクトル測定3回を、各ステップを通じて繰り返した。このとき、標準化解裂エネルギーは35％とした。また、マイクロスキャンは、MSスペクトル測定及びMS／MS測定ともに3とした。さらに、動的排除設定は、リピートカウント1、リピート期間0．50分、排除リストサイズ25、排除期間10．00分とした。

[0043] 得られたMS／MSスペクトルは、Bioworksソフトウエア（Thermo Fisher Scientific社製）上で動くSEQUESTアルゴリズムにより、非冗長ヒトデータベース（ftp:／／ftp.ncbi.nih.gov／blast／db／FASTA／nr.gz、2007／2／8版）に対して、検索した。

[0044] その結果、図2に列記ような受容体候補タンパク質が同定された。これらのタンパク質の中から、バシジン（エンプリン）をS100A9の新規受容体として以下の実験を行った。

[0045] 2．siRNAによるエンプリンの発現抑制

エンプリンの発現抑制のために、RNAi Maxを用いて、エンプリンsiRNA (Santa Cruz : sc-35298) を、終濃度40 nM又は80 nMとなるように増殖期の培養ケラチノサイトにトランスフェクションした（図3中の「BSG」）。コントロールとして、何も添加していないもの（図3中の「NT」（non-treated control））およびヒト遺伝子のいずれの部分とも相同性を有していないcontrol siRNA-A (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-3707)（図3中の「LF」）を

使用した。尚、トランスフエクションは、培養培地を増殖因子を含まない基礎培地に交換してから行った。トランスフエクションから24時間後にS100A9で増殖ケラチノサイトを刺激し、さらに24時間経過後にRNAを採取した。その結果、図3に示すとおり、エンプリンsiRNAをトランスフエクションした場合、24、48、72時間後には、上記コントロールを用いた場合のエンプリンの発現量と比較して1～3％まで発現が抑制された。

[0046] 3．エンプリンの発現抑制によるサイトカイン及びMMPの発現変化

IL-8（CXCL—8）、TNFα、IL1_F9、CXCL—1は、S100A8／A9の添加により、ケラチノサイトでの発現が亢進されることが明らかとなっている（前掲J Cell Biochem. (2008) 104:453-464）（非特許文献8）。S10OA9の添加によってもIL_8（CXCL—8）、TNFα、IL1-F9及びCXCL-1の発現が亢進されるか、また、エンプリンの発現抑制がこれらのサイトカインの発現にどのような影響を与えるかについてリアルタイム定量PCRにより検討した。同様の方法により、S100A9刺激がMMP—1及びMMP—10の発現に及ぼす影響についても検討した。

[0047] リアルタイム定量PCR

EpiLife（商標）-KG2 (Cascade Biologies社）中で培養した増殖期のNHEKを、2mMの塩化カルシウム、S100A8またはS100A9（各10μg／ml）を含有又は非含有の同培地に置換し、3時間にわたり曝露させ、MagNA（商標）Pure mRNA抽出キットおよびMagNA Pure（商標）機器（Roche Diagnostics社、日本国、東京都）を用いてmRNAを抽出した。得られたmRNAは、Superscript（商標）II（InVitrogen Corporation社、米国、カリフォルニア州、カールズバッド）を用いて逆転写させた。リアルタイム定量PCRは、製造業者の取扱説明書にしたがってLightGycler FastStart DNA master SYBR green Iキット(Roche Diagnostics社）を用いてLightGycler高速サーマルサイクラーシステム上で実施した。典型的な反応条件は、1

０分間の活性化ステップ、それに続く９５℃で１５秒の変性、６０℃で１０秒のァニーリング、７２℃で１０秒の伸長からなるサイクル４０回であった。使用したプライマーは、下記の表１に示す。各プライマーの最終濃度は２０〃ｌの総反応容量中で０．２〜０．２５〃Ｍとした。グリセルアルデヒド＿３—リン酸脱水素酵素 (ＧＡＰＤＨ) 遺伝子を対照遺伝子として使用した。増幅させたフラグメントの特異性は融解曲線分析によって確認した。各遺伝子の発現レベルは、LightGycler分析用ソフトウエアを用いて定量分析した (非特許文献１１ :Morrison TB et aに, Biotechniques (1998) 24:954-958, 960, 962) 。目的のｍＲＮＡ量は、Ａ８/controlsiRNA-A (santa Cruz : sc-37007) (Ａ８／ＬＦ) のｍＲＮＡの量に対する比率として表した。

[0048]

ほ 1]

定量RT-PCRに用いたプライマー

遺伝子	順方向プライマー	逆方向プライマー	長さ
IL-8	GA G GCACACA 己 I 号2	AATCAGGAAGGCTGCCAA（配列番号３）	bp
TNFα	GACAAGCCTGTAGCCCATGT（配列番号４）	TTGATGGCAGAGAGGAGGTT（配列番号５）	
IL1F9	AGGAAGGGCCGTCTATCAAT（配列番号６）	AATGTGGGCTGTTCTCCAAC（配列番号７）	258 bp
CXCL1	AACCGAAGTCATAGCCACAC（配列番号８）	GTTGGATTTGTCACTGTTCAGC（配列番号９）	
S100A8	GGGCAAGTCCGTGGGCATCATGTTG（配列番号10）	CCAGTAACTCAGCTACTCTTTGGGCTTTCT（配列番号11）	313 bp
S100A9	GCTCCTCGGCTTTggGACAGAGTGCAAG（配列番号12）	GCATTTGTGTCCAGGTCCTCCATGATGTGT（配列番号13）	240 bp
GAPDH	CGG TT G （配歹 号14）	TGGGATTTCCATTGATGACA（配列番号15）	200 bp

[0049] 図４に示すとおり、Ｓ１００Ａ９を添加した試料 (Ａ９／ＬＦ）は、全てのサイトカインの発現を誘導した。一方、エンプリンSiRNAを添加した試料（Ａ９／ｓｉＲＮＡ）は、全てのサイトカイン発現量が有意に低下した。これ

は、エンプリンsiRNAによってエンプリンの発現が抑制された場合、S100A9でサイトカインの発現を刺激してもサイトカインの発現が抑制されることを明確に示している。

[0050] MMPについても、S100A9を添加した場合、発現が亢進されるのに対し、エンプリンがノックダウンされている場合、S100A9を添加しても発現が有意に抑制されることが明らかとなった（図5）。

[0051] 4．エンプリンとS100タンパク質との結合試験

1）エンプリン細胞外ドメインの作製

[方法]

細胞：ヒト胎児腎細胞株（HEK293）はATGG社より購入したものを使用し、培養ヒト正常線維芽細胞0UMS-24は、難波正義博士により単離されたものを使用した。HEK293と0UMS-24は、Gibco社のDMEM/F12培地（最終濃度が10%となるように牛胎児血清を添加）を用いて培養した。

[0052] 2）エンプリン細胞外ドメイン発現コンストラクト：

CMVイントロンプロモーター（GMVi）を導入したPDNR 1rベクター（プロモーターレスドナーベクター；Glontech社）を構築し、GMViの下流にヒトエンプリン細胞外ドメイン（G末にmyc_HA_Flag_6Hisタグが付加されている）をコードするcDNAを挿入した（pGMVi_exE 國 p：エンプリン細胞外ドメイン発現ドナーベクター）。挿入cDNAの塩基配列はDNAシークエンサーにより正しいことを確認済みである。

[0053] 3）エンプリン細胞外ドメインの細胞外への分泌：

pGMVi_exE 國 pを、FuGENE_HD（Roche社）トランスフヱクションヨン試薬を用いてHEK293に導入し、48時間後に培養上清を回収した。培養上清にSigma社の抗HA tag抗体共有結合担体を添加し、4℃で3時間振盪混和した。その後、5000 rpm、1分間の遠心分離を行い、沈降してきた担体結合タンパク質を酸性バッファーにより溶出した。溶出サンプルを12%のSDS-PAGEを用いて電気泳動した後、PVDF膜にエレクトロブロットして、GST社の抗HA tag抗体を用いてウェスタンブロットを行い、エンプリン細胞外ドメインが分

泌されていることを確認した。

[0054] 4）エンプリン細胞外ドメイン発現アデノウイルス（Ad_exE國p）：

pGMVi_exE國p のアデノウイルスベクターへの変換は、アデノウイルス作製キット(Adeno_X_expression system: Clontech 社)を使用して行った。

[0055] 5）エンプリン細胞外ドメインの大量精製：

Ad_exE國p (20 M0I)を培養ヒト正常線維芽細胞 0UMS-24 （10 cm dish x 20)に感染させた。感染させる時期は、0UMS-24 が高密度状態になった時とした。これは、高密度培養により接触阻止が惹起された細胞では細胞分裂が起こらず、細胞内に存在するアデノウイルス由来エピソーム含量の低下が抑制され、その結果、アデノウイルスによる標的遺伝子発現が極めて長期間（2-3週間）持続するからである。しかも、0UMS-24 は無血清培養が可能であることより、長期に渡って培養上清中に分泌された組み換えタンパク質を、血清を含まない状態で回収することができる。感染操作後、２４時間培養して無血清培地 DMEM/F12（フヱノールレッド不含）に置換する。３日の間隔で液換えを行い、その度に培養上清を回収して４℃で保存する (タンパク質の安定性に応じて保存条件を変える)。この操作を３０日間行った。約２Ｌの回収培養上清について、８０％飽和硫安条件で得られた沈殿を５０ｍｌの純水に溶かし、その後、純水に対して透析することで硫安を除いた。透析後、目的の組み換えタンパク質は、抗 HA tag 抗体共有結合担体充填カラム(sigma 社)を用いて回収した。

[0056] 6）エンプリン結合タンパク質の同定：

エンプリンがＳ１００タンパク質の新規レセプターであることを確認するべく、免疫沈降及びウエスタンブロットによりエンプリン結合タンパク質の同定を行った。本実験において、エンプリンはG末にmyc_HA_Flag_6Hisタグが付加されているものを使用した。また、Ｓ１００タンパク質としてＳ１００八8及び３１００Ａ９タンパク質を使用した。これらのタンパク質がコードされているプラスミド(G末にHAタグが付加されている)をそれぞれHEK293 細胞にトランスフエクションし、その培養上清からそれぞれのタンパク質を単離

して使用した。

[0057] エンプリンとＳ１００Ａ８及びＳ１００Ａ９タンパク質の結合解析のために、それぞれのタンパク質が含まれる培養上清を混合して反応させた後、HA抗体及びMyc抗体を用いて免疫沈降を行った。ウェスタンブロットの結果を図６に示す。エンプリンとＳ１００Ａ８とを混合した試料については、３２ｋＤａ付近にエンプリンのバンドのみが確認された（「Emprin + S100A8J ）。—方、エンプリンとＳ１００Ａ９タンパク質とを混合した試料では（「Emprin + S100A9J ）、４７．５ｋＤａ付近にそれらの結合を示すバンドが確認された。以上の結果から、エンプリンはＳ１００Ａ９タンパク質の新規レセプター候補であることが明らかとなった。

[0058] ５．可溶性エンプリンのＭＭＰ発現に及ぼす影響

従来、ＭＭＰの発現亢進は、エンプリンの細胞外ドメインがＭＭＰにより分解され、放出された可溶性のエンプリンが細胞表面に存在する受容体としてのエンプリンに結合し、ＭＭＰの産生を促すというエンプリンの自己分泌（オートクリン）に起因すると考えられていた。従って、可溶性エンプリンが実際にＭＭＰの発現を亢進させるか否かについて検討した。

[0059] 可溶性エンプリンとして上記方法により精製したエンプリン細胞外ドメィンを用い、これをケラチノサイトに添加したところ、０．０２５、０．２５、２．５μＭのいずれの濃度でもＭＭＰ_１誘導効果はほとんど見られなかつた。また、Ｓ１００Ａ９単独ではＭＭＰ—１の発現が顕著に亢進されたのに対し、可溶性エンプリンとＳ１００Ａ９とを一緒にケラチノサイトに添加した場合、Ｓ１００Ａ９によるＭＭＰ１発現亢進効果は有意に抑制された。結果を図７に示す。可溶性エンプリンとＳ１００Ａ９とが共存した場合にＭＭＰの発現が抑制されたのは、ＭＭＰ産生を誘導するＳ１００Ａ９力、可溶性エンプリンに捕捉され、両者が結合体したことによるものと考えられる。これらの結果から、従来提唱されていたエンプリンの自己分泌によるメカニズムより、Ｓ１００Ａ９刺激がエンプリンを通じてＭＭＰの発現を亢進させるというメカニズムの方が合理的と思われる。結果は示さないが、可溶性エ

ンプリンはＭＭＰ＿１０、ＴＮＦひ、ＩＬ—８の発現も有意に抑制した。

[0060] ６．表皮におけるエンプリンの局在

１）免疫染色

エンプリンがヒト表皮に存在するか、また、Ｓ１００タンパク質と同一局在を示すかについて、免疫染色により確認した。結果を図８Ａ〜Ｃに示す。エンプリンは、正常表皮、皮膚モデル、アトピー性皮膚炎 (ＡＤ) の皮膚のいずれでも顆粒層で多く発現している。また、Ｓ１００タンパク質もエンプリン付近で発現していた。

[0061] 更に、アトピー性皮膚炎の皮膚では、エンプリンが高発現しており、Ｓ１００Ａ８及びＳ１００Ａ９タンパク質の発現も亢進されていることが明らかとなった。また、Ｓ１００Ａ８／Ａ９複合体を特異的に結合する２７Ｅ１０抗体を用いた免疫染色の結果は、乾癬 (Ｐｓｏ) の皮膚と比較した場合、アトピー性皮膚疾患の皮膚の顆粒層でＳ１００Ａ８／Ａ９複合体が高発現していることを示している (図８Ｄ及び図８Ｅ) 。

[0062] 免疫染色の結果によると、正常表皮では、Ｓ１００Ａ８、Ａ９、エンプリンはほとんど発現していない。しカし、メラノーマ組織におけるＳ１００Ａ９の発現について免疫染色により確認したところ、いずれのサンプルでも表皮側にＳ１００Ａ９の強発現が認められた (図８Ｆ、左側、中央、右側の写真)。また、正常部位ではＳ１００Ａ９の発現はほとんど認められないのに対し、悪性メラノーマ (Clark' s level III) では、メラノーマ細胞の浸潤に対応するように基底層直上の表皮にＳ１００Ａ９が発現していることが確認された (図８Ｇ) 。一方、同じ腫瘍塊でも、母斑組織では表皮側にＳ１００Ａ９の発現は認められなかった。

[0063] Ｓ１００Ａ９抗体とエンプリン (ＣＤ１４７) 抗体を用いて免疫染色した部位について、エンプリン抗体に代えてメラノーマ特異的抗体 (ＨＭＢ４５) を用いて染色したところ、メラノーマ特異的抗体により染色される部位がエンプリン抗体のものと重複していた (図８Ｈ) 。この結果により、エンプリンは浸潤するメラノーマ細胞において発現していることが確認された。

[0064] ２）アトピー皮膚におけるエンプリンとＳ１００Ａ９の相互作用の証明

エンプリンとＳ１００Ａ９タンパク質と九　単に結合しているだけでなく、実際に相互作用していることをPLA (Proximity Ligation Assay) 法により確認した。PLA法によれば、ＤＮＡプローブで標識された２種類の抗体を用い、蛍光色素をラベルした相補的DNAをハイブリダィズさせることで、それらのタンパク質が相互作用しているか否かを明らかにすることができる。PLA法は、通常の免疫染色と比較してはるかに高感度である。

[0065] 01ink社のDuolink in situ PLAキットを用い、相互作用試験を行った。ァトビー患者から得られた患部皮膚組織を、4% パラホルムアルデヒドで固定後、通常の方法でパラフィンに包埋した。４μｍで細切後、キシレン処理、エタノール処理を経てPBSにて洗浄し、ブロッキング後、一次抗体 (以下の表１参照）と４℃で一晩反応させた。PBSで洗浄後、PLAプローブ (以下の表１参照）と、３７℃で２時間反応させた。

[0066]

NAプローブの増幅を行った。Detection kit 613 (Olink社) を用いて蛍光色素をラベルし、顕微鏡観察を行った。結果を図9及び図10に示す。

[0068] エンプリンとS100A9抗体とを用いてPLA法を行った場合、有棘層から顆粒層付近に強い陽性反応が認められた (図9)。これは、エンプリンとS100A9とが相互作用をしていることを示すものである。一方、S100A8についても、顆粒層付近に陽性反応が認められたが、これはS100A9とダイマーを形成した結果によるものと考えられる (結果は示さない)。

[0069] 7. エンプリン細胞外ドメインへのS100A8、S100A9タンパク質の結合を阻害する薬剤のスクリーニング

1) リコンビナントS100A8、S100A9の調製とビオチン化：

ヒトS100A8、S100A9をGST融合タンパク質として大腸菌で産生させ、グルタチオン共有結合担体によるアフィニティークロマトグラフィーで精製した。その後、GSTを切断・除去した。精製したS100A8、S100A9タンパク質のビオチン化については次の方法をとる。各精製タンパク質濃度に対して3倍モル量の Biotin-(AC5) 2Sulfo-0Su (Dojindo社) を混合した。室温で2時間反応させた後に Nap-5 (GE Healthcare 社) により未反応のビオチン化試薬を除いた。

[0070] 2) エンプリン細胞外ドメインへのS100A8、S100A9タンパク質の結合を阻害する薬剤のスクリーニング：

リコンビナントエンプリン細胞外ドメイン (図1中のsignal peptideの後から、transmembrane domainの前に相当) を96 well プレート (Pierce 社) のゥエル上に結合させる。ゥエルを洗浄後、非特異的吸着を抑えるため、各ゥエルは5%BSAその他のブロッキング剤で処理する。次に試験する薬剤 (対象としては、溶媒のみ) をゥエル内に添加して室温で1時間インキュベートする。ゥエルを洗浄後、リコンビナントS100A9W (エンプリンの全長配列) を加え室温で1時間インキュベートする。さらにHRP標識した抗S100A9抗体を同ゥエル内に添加して反応させる。再度洗浄し、発色基質 (オルソフエニレンジアミン) を添加して ELISAリーダーで吸光度 (O. D. 492 nm) を測定する。この

操作により、まずはエンプリンとＳ１００Ａ９（又はＳ１００Ａ８／Ａ９）との結合における検量線を作製する。次にこの結合を阻害する分子のスクリーニングを行う。上記のアツセィ系に薬剤を添加し、吸光度の低下するものを候補薬剤とする。

[0071] 種々の植物抽出物を上記スクリーニング方法にかけたところ、ヨモギエキス、トウキエキス、ォドリコソゥエキスがコントロールよりも有意にエンプリンとＳ１００Ａ９との結合を阻害することが明らかとなった（図１１）。中でも、ヨモギエキスは強い阻害効果を示した（図１２）。

請求の範囲

[請求項1] 慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補物質がエンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を有意に阻害する場合に、当該候補物質は慢性炎症又は癌転移を有意に抑制させると評価する、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤のスクリーニング方法。

[請求項2] 慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤をスクリーニングする方法であって、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤の候補物質の存在下、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９とをインキュベートし、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する物質を慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤として選定することを含んで成る、請求項１に記載の方法。

[請求項3] エンプリンが固体支持体に固相化されている、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記結合の阻害がＥＬＩＳＡ法により決定される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する薬剤を含んで成る、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤。

[請求項6] 前記薬剤が、ヨモギ、トウキ及びオドリコソウから成る群から選択される植物体又はその抽出物を一種又は二種以上含む、請求項５に記載の慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤。

[請求項7] 慢性炎症又は癌転移の抑制方法であって、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する薬剤を、慢性炎症又は癌転移の治療を必要とする被験者に投与することを含んで成る、方法。

[請求項8] 前記薬剤が、ヨモギ、トウキ及びオドリコソウから成る群から選択される植物体又はその抽出物を一種又は二種以上含む、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 慢性炎症又は癌転移を抑制するための、エンプリンとＳ１００Ａ９

又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する薬剤の使用。

[請求項10] 前記薬剤が、ヨモギ、トウキ及びォドリコソゥから成る群から選択される植物体又はその抽出物を一種又は二種以上含む、請求項９に記載の使用。

[図1]

図1

Signal peptide

MAAALFVLLGFALLGTHGASGAAGTVFTTVEDLGS 35

1st. Ig Domain

KILLTCSLNDSATEVTGHRWLKGGVVLKEDALPGQ 70

Cleavage site

KTEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPP 105

RVKAVKSSEHINCKSESVPPVTDWAWYKITDSEDKA 140

2nd. Ig Domain

LMNGSESRFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRC 175

Transmembrane domain

EGETAMLVNGTSSKGSDQAIITLRVRSHLA

[図2]

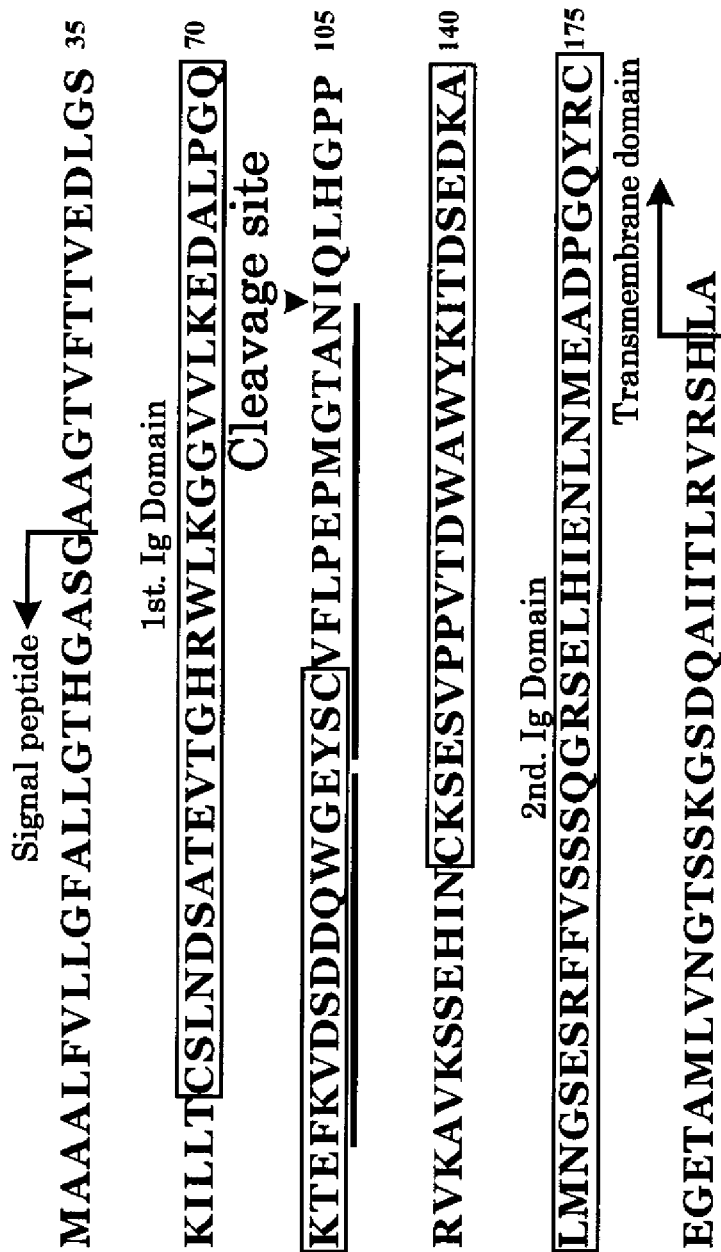



図2

Scan(s)	Peptide
1	S100 calcium-binding protein A9 [Homo sapiens]
2	colligin [Homo sapiens]
3	Chain , Glutathione S-Transferase (E.C.2.5.1.18) Fused With A Conserved Neutralizing Epitope On Gp41 Of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Complexed With Glutathione
4	K1C9_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9) (K9)
5	KRHU2 keratin 1, type II, cytoskeletal - human
6	A Chain A, Crystal Structure Of Human Glutathione S-Transferase P1-1[v104] Complexed With (9r,10r)-9-(S-Glutathionyl)-10- Hydroxy-9,10-Dihydrophenanthrene
7	unnamed protein product [Homo sapiens]
8	heme oxygenase (decyclizing) 2 [Homo sapiens]
9	calnexin precursor [Homo sapiens]
10	chaperonin [Homo sapiens]
11	K1C10_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin-10) (K10)
12	glutathione transferase [Homo sapiens]
13	unnamed protein product [Homo sapiens]
14	keratin 1 [Homo sapiens]
15	heat shock 70kDa protein 9B precursor [Homo sapiens]
16	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor [Homo sapiens]
17	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) [Homo sapiens]
18	beta actin [Homo sapiens]
19	A Chain A, Crystal Structure Of A DictyosteliumTETRAHYMENA CHIMERA Actin (Mutant 646: Q228kT229AA230YA231KS232EE360H) IN Complex With Human Gelsolin Segment 1
20	RAB2B protein [Homo sapiens]
21	tumor rejection antigen (gp96) 1 [Homo sapiens]
22	annexin A2 isoform 2 [Homo sapiens]
23	solute carrier family 25, member 5 [Homo sapiens]
24	RAB14, member RAS oncogene family [Rattus norvegicus]
25	heat shock 90kDa protein 1, beta [Homo sapiens]
26	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2 isoform f [Homo sapiens]
27	Acyl-CoA synthetase 3 [Homo sapiens]
28	K22E_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e) (CK 2e)
29	TSP1_HUMAN Thrombospondin-1 precursor
30	basigin isoform 1 [Homo sapiens]
31	ATRB actin, skeletal muscle - rabbit
32	A Chain A, Crystal Structure Of Caenorhabditis Elegans Mg-Atp Actin Complexed With Human Gelsolin Segment 1 At 1.75 A Resolution

[図3]

図3

BSG
Ratio BSG/GAP
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NT, control
LF, control
BSG 40nM
BSG 80nM
*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, + p<0.1
*** ***
24h
48h
72h

[図4]

図4
IL8
*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, +p<0.1
Ratio to A8 /LF control
TNF α
*** p<0.001, ** p<0.01,
* p<0.05, +p<0.1
Ratio to A8 /LF control
IL1F9
*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, +p<0.1
Ratio to A8 /LF control
CXCL1
*** p<0.001, ** p<0.01,
* p<0.05, +p<0.1
Ratio to A8 /LF control
control
neg.RNA
siRNA
A9/LF
A9/neg.RNA
A9/siRNA

[図5]

図5

MMP10
Fold Increase
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
Control
A8/A9(2 uM)
siCont
siCont+A8/A9
siEmmprin
siEmp+A8/A9
A8 only
siEmp+A8
A9 only
siEmp+A9

MMP1
Fold Increase
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
Control
A8/A9(2 uM)
siCont
siCont+A8/A9
siEmmprin
siEmp+A8/A9
A8 only
siEmp+A8
A9 only
siEmp+A9

[図6]

図6
IP & WB: anti-HA
HA antibody agarose
Myc antibody agarose
Emprin
S100A8
S100A9
Emprin
S100A8
S100A9
Emprin + S100A8
Emprin + S100A9
kDa
175
83
62
47.5
32
25
16.5

[図7]

図7
Fold Increase
5
4
3
2
1
0
control
sol.Emp(0.025)
sol.Emp(0.25)
sol.Emp(2.5)
cont-A9
sol.Emp(0.025)+A9
sol.Emp(0.25)+A9
sol.Emp(2.5)+A9

[図8A]

[図8B]

図8B

[図8C]

[図8D]

[図8E]

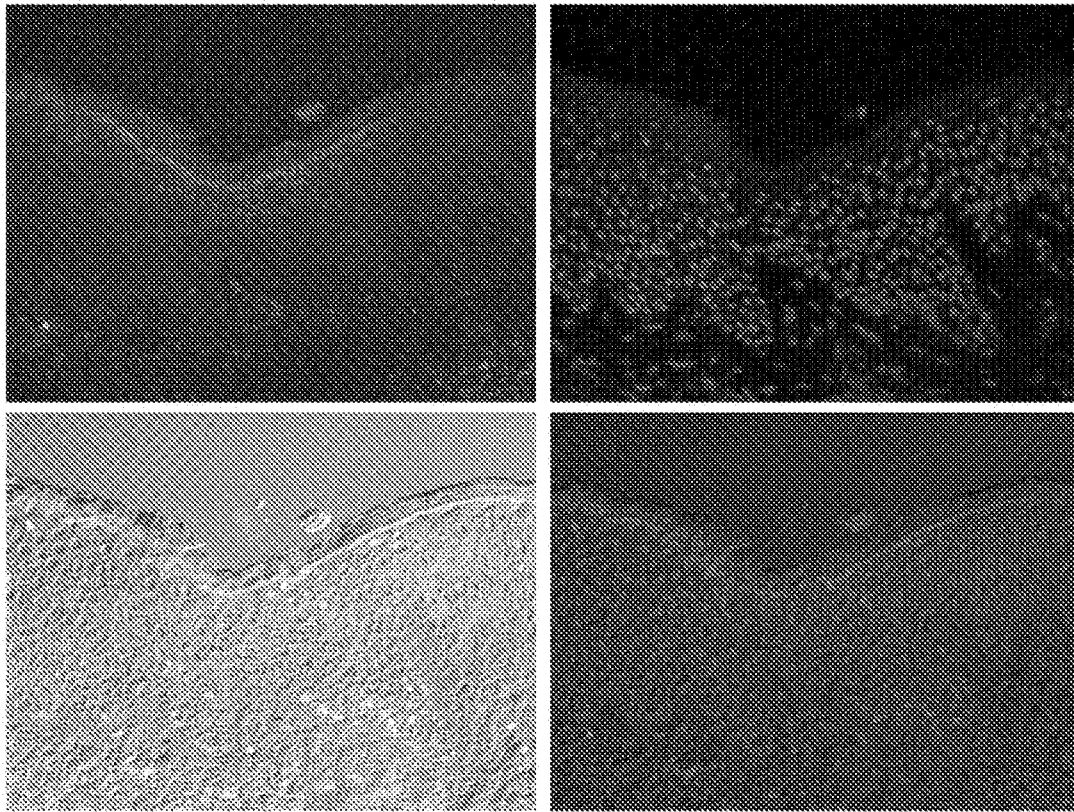
[図8F]

[図8G]

[図8H]

[図9]

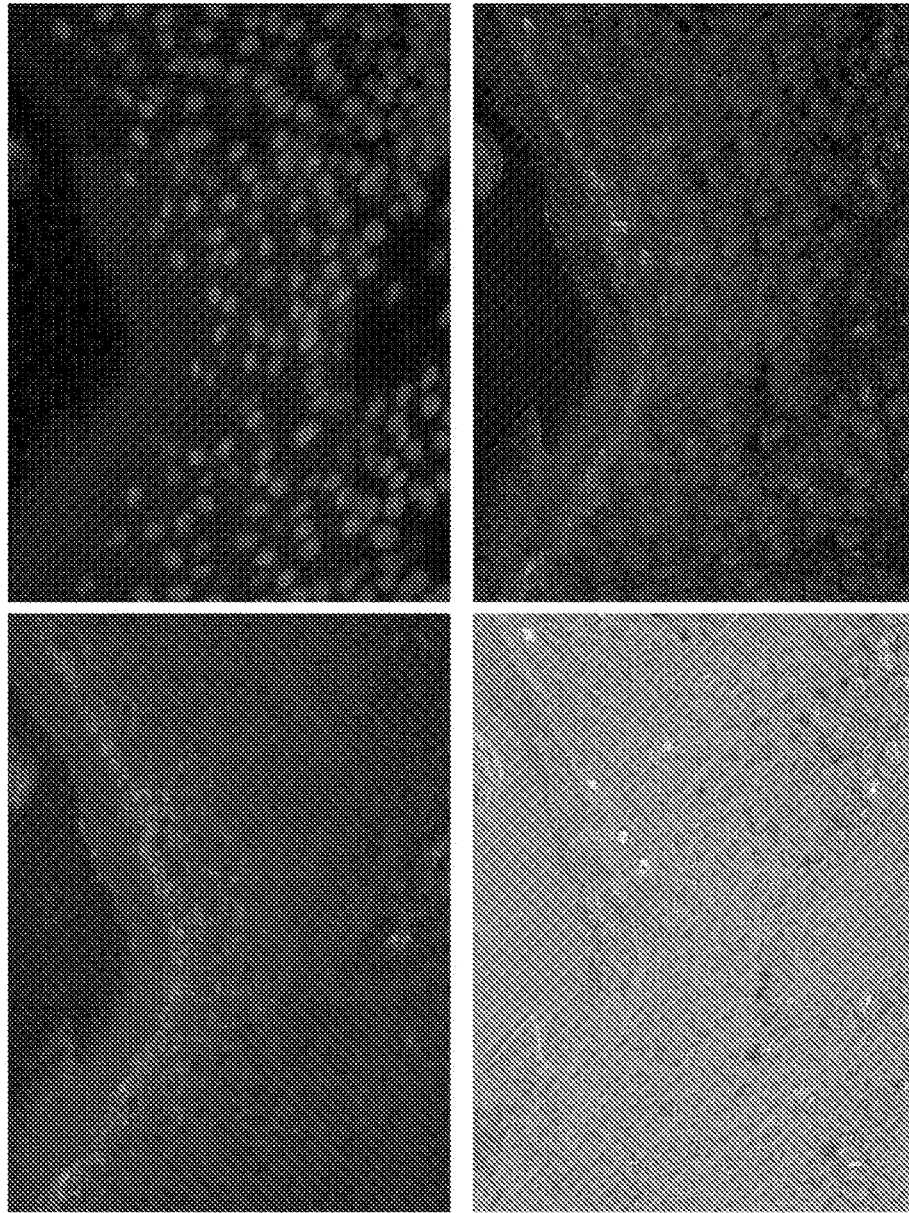
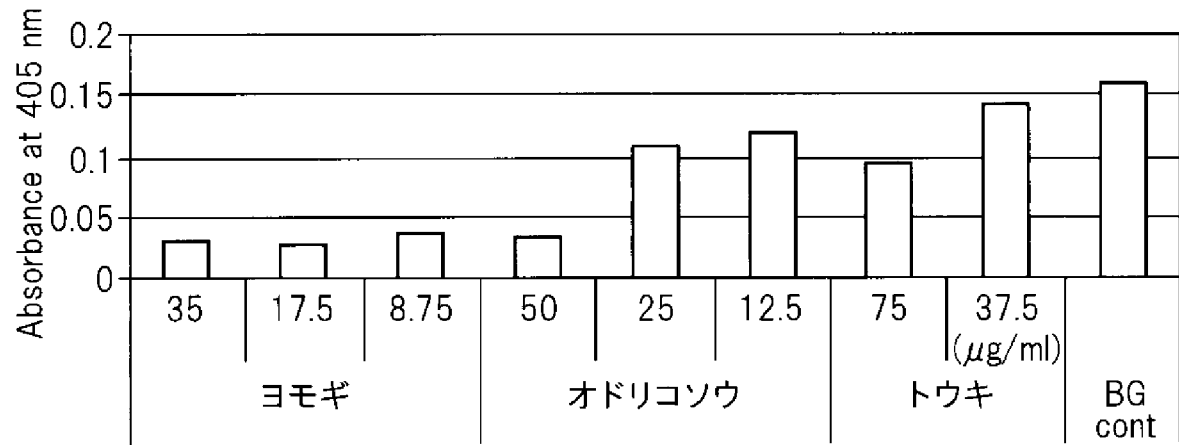
図9

Emmprin & S100A9 (×200)

[図10]

[図11]

図11
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
PBS
BG
エリスリトール
ヨモギ
ユキノシタ
トウキエキス
オドリコソウ
オウバクエキス
ローズマリー
イチョウ葉エキス
イザヨイバラ
ハマメリス
エクトイン
ビワ
ジュウヤク
エクトイン
1.3-ブチレングリコール

[図12]

図12
Absorbance at 405 nm
0.2
0.15
0.1
0.05
0
35
17.5
8.75
50
25
12.5
75
37.5
(μg/ml)
ヨモギ
オドリコソウ
トウキ
BG
cont

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/051807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/50 (2006.01)i, A61K36/23 (2006.01)i, A61K36/28 (2006.01)i, A61K36/53 (2006.01)i, A61K45/00 (2006.01)i, A61P29/00 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, G01N33/15 (2006.01)i, G01N33/53 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/50, A61K36/23, A61K36/28, A61K36/53, A61K45/00, A61P29/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Hibino T et al., Identification of a Novel Receptor For S100a8/A9, A Key Mediator of Inflammation in human Skin, J Invest Dermatol, 2009.09, Volume 129, Issue S2, S88	1-4 5-6
A	Nukui T et al., S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes, J Cell Biochem, 2008.05.15, 104(2), 453-464	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 March, 2011 (11.03.11)	Date of mailing of the international search report 29 March, 2011 (29.03.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/051807

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 7-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 7 to 10 pertain to methods for treatment by therapy.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
The inventions in claims 1 to 4 relate to a method for screening a substance which significantly inhibits the binding of Emmprin to S100A9 or S100A8/A9.

The inventions in claims 5 to 10 relate to a chronic inflammation inhibitor or a cancer metastasis inhibitor each comprising a drug inhibiting the binding of Emmprin to S100A9, and a method for inhibiting chronic inflammation or cancer metastasis using said drug.

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [X] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP2011／051807

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/50 (2006. 01) i , A61K36/23 (2006. 01) i , A61K36/28 (2006. 01) i , A61K36/53 (2006. 01) i, A61K45/00 (2006. 01) i , A61P29/00 (2006. 01) i , A61P35/00 (2006. 01) i , G01N33/15 (2006. 01) i, G01N33/53 (2006. 01) i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/50, A61K36/23, A61K36/28, A61K36/53, A61K45/00, A61P29/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922－
日本国公開実用新案公報 1971－2
日本国実用新案登録公報 1996－
日本国登録実用新案公報 1994－2

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	Hibino T et al. , Identincation of a Novel Receptor For S100a8/A9, A Key Mediator of Inflammation in human Skin, J Invest Dermatol, 2009. 09 , Volume 129 , Issue S2 , S88	1-4 5-6
A	Nukui T et al. , S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes, J Ceil Biochera, 2008. 05. 15, 104 (2) , 453-464	1-6

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。　□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 11. 03. 2011	国際調査報告の発送日 29. 03. 2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA／JP) 郵便番号100—8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 2J 3316 赤坂 祐樹 電話番号 03—3581—1101 内線 3252

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/051807

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☑ 請求項 7-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項7—10に係る発明は、治療方法に関する発明である。

2. □ 請求項 ＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. □ 請求項 ＿＿＿ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
請求項1—4に係る発明は、エンプリンとS100A9又はS100A8/A9との結合を有意に阻害する物質をスクリーニングする方法に関する発明である。

請求項5—10に係る発明は、エンプリンとS100A9との結合を阻害する薬剤からなる、慢性炎症抑制剤又は癌転移抑制剤、及び当該薬剤を用いた慢性炎症又は癌転移の抑制方法に関する発明である。

1. □ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. □ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. □ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

□ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

□ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

□ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項５―６は、明細書によって十分に裏付けされていない。
明細書によって裏付けされているのは、ヨモギ、トウキ及びォドリコソゥから成る薬剤が、エンプリンとＳ１０ＯＡ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する点にとどまり、当該薬剤が、慢性炎症又は癌転移を抑制するかどうかについては明細書において何ら検証されていない。
また、エンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合が阻害されると、必然的に慢性炎症又は癌転移が抑制されるとの学術的証拠も示されていない。

請求項５は、明細書によって十分に裏付けされていない。
明細書によって裏付けられたェンプリンとＳ１００Ａ９又はＳ１００Ａ８／Ａ９との結合を阻害する薬剤は、ヨモギ、トウキ及びォドリコソゥから成る群から選択される植物体又はその抽出物にとどまり、それ以外の薬剤を包含する請求項５に係る発明の範囲まで一般化できるとはいえない。